

## MODIFIED IGM IMMUNOLOGICAL MEASURING REAGENT

Publication number: JP9127112

Publication date: 1997-05-16

Inventor: YOSHIMURA TORU

Applicant: DAINABOT CO LTD

Classification:

- international: G01N33/531; G01N33/576; G01N33/576; G01N33/531;  
G01N33/576; G01N33/576; (IPC1-7): G01N33/576;  
G01N33/531

- European:

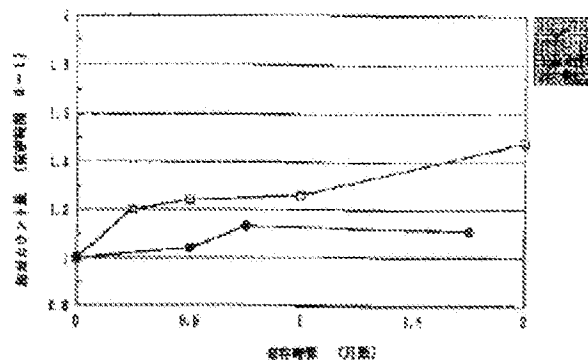
Application number: JP19950303302 19951030

Priority number(s): JP19950303302 19951030

[Report a data error here](#)

### Abstract of JP9127112

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To generate an immunoassay reagent stable and effective for a long period by reducing IgM-containing aqueous solution, then processing it with a modifying agent reactable to the free sulfhydryl group to obtain the IgM reagent. **SOLUTION:** IgM is reduced with a reducing agent, e.g. cystine or glutathione, it is processed with a modifying agent such as acetic halide or its derivative to prevent the free sulfhydryl group of the reduced IgM from forming S-S linkage, and the free sulfhydryl group is aminoethylated, S-methylated, or iodoacetylated. A liquid containing the modified IgM is coarsely refined by the salting-out process, dialysis, and filtration, then it refined by gel filtration chromatography, and an effective IgM reagent used for normal immunological measurement is obtained. This modified IgM or modified IgM-containing aqueous solution is excellent in preservation stability, and it can be simply used. A type-A hepatitis patient can be surely diagnosed and detected.



Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - Worldwide



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-127112

(43) 公開日 平成9年(1997)5月16日

(51) IntCl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531			G 0 1 N 33/531	A
// G 0 1 N 33/576			33/576	A

審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平7-303302

(22) 出願日 平成7年(1995)10月30日

(71) 出願人 000109015

ダイナボット株式会社

東京都港区六本木1-9-9 六本木ファーストビル

(72) 発明者 吉村 徹

千葉県松戸市稗台344番地 ダイナボット株式会社総合研究所内

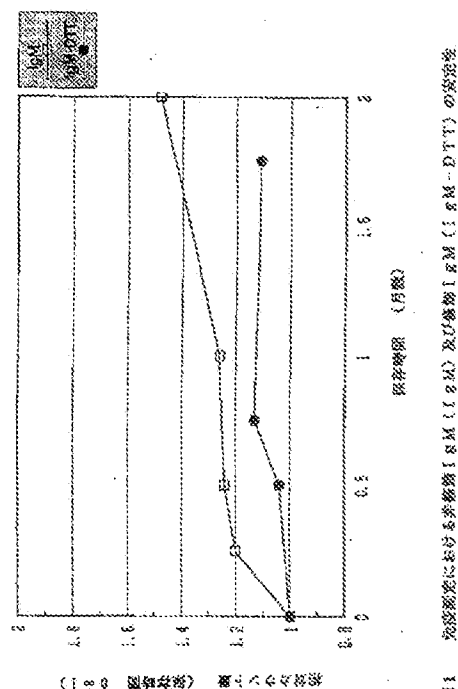
(74) 代理人 弁理士 水野 昭宣

(54) 【発明の名称】 修飾 I g M 免疫学的測定試薬

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 免疫学的測定の試薬として I g M 自体を利用する場合、その I g M が不安定であるという問題がある。こうした問題のない長い期間安定であり免疫測定試薬として有用な I g M を得る。特に H A V 関連抗体を検出したりする場合、被検試料の必要な測定範囲を簡単に設定できかつ特異的な I g M 抗体を検出する時、前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にする自動化に有利な安定化された I g M 試薬を得る。

【解決手段】 免疫学的測定法において使用するための I g M 試薬において、I g M または I g M 含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾 I g M または修飾 I g M 含有水溶液を該 I g M 試薬として用いる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫学的測定法において使用するためのIgM試薬において、IgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドрил基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液を該IgM試薬として用いることを特徴とする免疫学的測定試薬。

【請求項2】 IgMまたはIgM含有水溶液の還元処理が、システイン、ジチオスレイトール、及びグルタチオンから成る群から選ばれた還元剤で行われる請求項1記載の免疫学的測定試薬。

【請求項3】 遊離スルフヒドрил基と反応可能な修飾剤が、アミノアルキル化剤、S-アルキル化剤、ハロゲンアセチル化剤から成る群から選ばれたものである請求項1記載の免疫学的測定試薬。

【請求項4】 遊離スルフヒドрил基と反応可能な修飾剤が、ハロゲン化酢酸又はその誘導体、N-エチルマレイミド又はその誘導体、アリールジチオ化合物、アリールフェニルハライド、水銀誘導体化合物、スルホネート化合物、O-メチルイソ尿素、チオン酸又はその誘導体塩、2-ヒドロキシエチルジスルフィドから成る群から選ばれたものである請求項1記載の免疫学的測定試薬。

【請求項5】 遊離スルフヒドрил基と反応可能な修飾剤が、ヨード酢酸、ヨード酢酸アミド、プロモ酢酸、プロモ酢酸アミド、クロロ酢酸、クロロ酢酸アミド、2-プロモプロピオン酸、N-エチルマレイミド、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)、2, 2'-ジチオビスピリジン、4, 4'-ジチオビスピリジン、6, 6'-ジチオビスニコチン酸、2-ニトロスルフェニルクロリド、p-クロロマーキュリ安息香酸、p-ヒドロキシマーキュリ安息香酸、フェニル酢酸水銀、メチルp-ニトロベンゼンスルホネート、メチルメタンチオスルホネート、O-メチルイソ尿素、テトラチオン酸カリウム、テトラチオン酸ナトリウム、及び2-ヒドロキシエチルジスルフィドから成る群から選ばれたものである請求項1記載の免疫学的測定試薬。

【請求項6】 IgM試薬が標識剤で標識化されている修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液であることを特徴とする請求項1～5のいずれか一記載の免疫学的測定試薬。

【請求項7】 標識が、放射性同位体、酵素、発光性物質、蛍光性物質、及びビオチンから成る群から選ばれたものであることを特徴とする請求項6記載の免疫学的測定試薬。

【請求項8】 標識化されているIgM試薬がサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用するものであることを特徴とする請求項6又は7記載の免疫学的測定試薬。

【請求項9】 抗ヒトIgM抗体試薬を使用して被検試料中の対象抗原に対する特異的IgM抗体を免疫学的に

測定する方法において、少なくともヒトIgMまたはヒトIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドрил基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾ヒトIgMまたは修飾ヒトIgM含有水溶液からなる試薬により、被検試料を希釈することと特徴とする特異的IgM抗体測定方法。

【請求項10】 特異的IgM抗体がHAVに対するIgM抗体又はHBcに対するIgM抗体である請求項9記載の特異的IgM抗体の測定法。

【請求項11】 (1) 測定対象試料を必要に応じ緩衝剤、希釈液又は希釈剤の水溶液で希釈し、つぎにIgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドрил基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液からなる試薬により、試料を希釈した後、試料中の測定対象特異的IgM抗体を、抗ヒトIgM抗体結合固相担体と反応させて試料中のIgM抗体を固相抗ヒトIgM抗体と免疫学的に反応させ、

(2) (a) 得られた反応生成物に特定の抗原試薬を免疫学的に反応させ、さらに抗原試薬に対する抗体を標識剤で標識した標識抗体を免疫学的に反応させるか、又は(b) 得られた反応生成物に特定の抗原試薬を標識剤で標識した標識抗原を免疫学的に反応させることを特徴とする請求項9又は10記載の特異的IgM抗体の測定法。

【請求項12】 対象抗原を含有する被検試料に第1の抗体と第2の抗体を接触させることにより前記対象抗原と前記第1の抗体と前記第2の抗体とからなる複合体を形成させる工程を含む免疫学的測定方法において、前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれか一方が、少なくともIgMを還元処理し、ついで遊離スルフヒドрил基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMでありかつ当該IgMが標識剤で標識化されたものであることを特徴とする方法。

【請求項13】 前記被検試料を、当該被検試料中の対象抗原に対する固相担体に結合されている第1抗体(固相化抗体)及び標識されている第2抗体(標識抗体)とに接触させ、当該第1抗体と当該抗原と当該第2抗体との複合体を形成させ、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とする請求項12記載の方法。

【請求項14】 (i) (a) 対象抗原を含有する被検試料に固相担体に結合されている第1抗体を接触させることにより前記対象抗原を前記第1の固相化抗体に結合させ、必要に応じ固相を洗浄処理した後標識され且つ還元処理された修飾IgMである第2抗体を接触させることにより免疫複合体を形成させるか、あるいは(b) 対象抗原を含有する被検試料に標識され且つ還元処理された修飾IgMである第2抗体を接触させることにより前記対象抗原を前記第2の標識抗体に結合させ、次に固相

担体に結合されている第1抗体を接触させることにより免疫複合体を形成させ、(ii)必要に応じ固相を洗浄処理して、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とする請求項12又は13記載の方法。

【請求項15】 測定対象試料が、全血、血清、または血漿である請求項9～14のいずれか一記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫学的測定試薬として有用な修飾IgMを提供する。特に、IgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液は、抗ヒトIgM抗体試薬を使用して被検試料中の対象抗原に対する特異的IgM抗体、例えばA型肝炎ウイルス(Hepatitis A virus: HAV)感染の診断などにおける免疫学的に測定する方法において、試薬として有用である。また標識剤で標識化された当該還元処理を受けている修飾IgM試薬は、いわゆるサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系の標識抗体として有用である。

【0002】

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】免疫学的測定法は、人の臨床における検査や病気の診断に広く利用される他、動物についてもその臨床検査や病気の診断、さらにはその他の広い範囲の測定対象物の分析、測定、定量、検出などの分野において応用されている。この免疫学的測定法は、抗原とその抗原に対する抗体との間の抗原抗体反応を利用するものである。免疫グロブリン、すなわち抗体は、IgM、IgG、IgA、IgD及びIgEといったアイソタイプクラスに分類できることが知られており、そのうちIgGはさらにIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>及びIgG<sub>3</sub>といったサブクラスに副分類される。免疫グロブリンのうちIgMは最も大きな分子量を有し、約900,000というIgGに比して、5倍以上の大きさで、一般的にはIgGのペンタマーに相当すると考えられている。つまりIgMは一般に10個の重鎖と10個の軽鎖と1本のJ鎖とからなり、抗体結合部位が10個で、さらにグルコサミンオリゴ糖の結合した糖タンパク質である。IgMは免疫応答において最も初期に生成されてくる抗体と考えられている。ペンタマーであるIgMは、抗原と結合したときIgGクラス抗体よりも効率よく動物の補体系を刺激することから、赤血球凝集反応、溶血反応、溶菌反応、中和反応、抗原との凝集反応などを起こすことが知られている。

【0003】このIgMは、多糖類に対する特異性が高いことから、最近では癌関連抗原糖鎖に特異的な抗体として、癌診断に利用することが試みられている。こうしたIgMは、例えば酵素標識し、酵素免疫測定法に応用しようすると標識IgM抗体が非常に大きな重合体と

なり、測定時の非特異的吸着などが高くなり、測定の再現性に問題があったり、感度も低下することが知られている。一方上記したようにIgMは非常に低濃度でも細菌抗原やウイルス抗原などと反応するというようなその大きな抗体価を利用して、免疫測定試薬として利用することが図られている。特に急性期において生体内の免疫反応により生じる特異的IgM抗体を測定することは、例えば、ウイルス感染、病原菌感染などの初期感染の診断に用いられて有用であることから注目されている。このIgM測定を利用する免疫学的測定法の代表的なものとしては、IgM抗体捕捉測定法が挙げられ、例えば、A型肝炎ウイルス感染の診断、B型肝炎ウイルスコア抗原(Hepatitis B virus core antigen: HBeC)、風疹、麻疹、ムンプスなどの診断などに利用されている。

【0004】このIgM測定を利用する免疫学的測定法においては、通常抗ヒトIgM抗体試薬を使用して被検試料中の対象抗原に対する特異的IgM抗体を免疫学的に測定することが行われているが、この時被検試料を少なくともIgMまたはIgM含有水溶液により希釈することにより、被検試料の必要な測定範囲を簡単に設定でき、より早い時期で特異的なIgM、例えば、HAV関連抗体を検出したり、前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にする自動化された測定系に適した測定方法が見出されている。しかしながら、試薬としてIgM自体を利用する場合、そのIgMが不安定であるという問題があった。また、IgMは多価抗体であることから、非常に低濃度でも細菌やウイルスといった抗原や赤血球と反応し、凝集を起こす働きがあることが観察されている。また、IgMはIgGなどと比較して巨大な分子であるためか、凝集する傾向があり、一般に精製された形態で安定化することは比較的困難とされている。

【0005】特にIgM自体を試薬として用い、例えば検体試料の希釈を行うと、IgMは希薄溶液で不安定で、希薄溶液として使用しようすると極めて容易に凝集して、測定に影響を与えるという問題があった。このようにIgMは一般的に非常に不安定で、様々な物理的あるいは化学的ストレスによって容易に凝集沈殿してしまい、試薬として使用するのに問題であった。こうした不安定なIgMは、濃縮溶液あるいは乾燥粉末として保存し、使用直前に希釈せざるを得ないが、これでは測定の度毎に特定濃度のIgM希釈液を調整する必要があるなど、さらに長期間の保存が困難などの問題があった。また、免疫学的測定試薬としては、安価かつ大量に安定して供給されることも重要である。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記した問題のない希釈溶液としても長い期間安定であり、免疫測定試薬として有用な、特にHAV関連抗体を検出したり

する場合、被検試料の必要な測定範囲を簡単に設定できかつ特異的なIgM抗体を検出する時前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にする自動化された測定系に適したIgMを得るべく、鋭意研究を行った結果、簡単な方法によりそれらの問題を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

【0007】本発明は、免疫学的測定法において使用するためのIgM試薬において、IgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液を該IgM試薬として用いることを特徴とする免疫学的測定試薬を提供するものである。またより具体的な態様では、本発明は抗ヒトIgM抗体試薬を使用して、被検試料中の対象抗原に対する特異的IgM抗体を免疫学的に測定する方法において、被検試料を少なくともIgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液からなる試薬により希釈することとを特徴とする特異的IgM抗体測定試薬及びその試薬を用いた測定方法を提供する。

【0008】本発明は、さらに被検試料中の抗原を免疫学的に測定する方法において使用するためのIgM試薬において、IgM抗体試薬を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られたIgM抗体であり且つ当該IgM抗体は標識剤で標識化して得られた標識IgM抗体であることを特徴とする免疫学的測定試薬及びその試薬を用いた測定方法を提供する。より具体的な態様では、対象抗原を含有する被検試料に第1の抗体と第2の抗体を接触させることにより前記対象抗原と前記第1の抗体と前記第2の抗体とからなる複合体を形成させる工程を含む免疫学的測定方法において、前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれか一方が、IgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液でありかつ当該IgMが標識剤で標識化されたものであることを特徴とする方法が提供される。好ましくは標識IgM抗体試薬は、サンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用することができる。

【0009】

【発明の実施の形態】 IgMを含む試薬溶液としては、特に限定されないが、動物の血清、例えばヒト血清、ハイブリドーマを移植した動物の腹水液、ハイブリドーマ及びリンパ球の培養液、遺伝子工学的にIgM様抗体を分泌せしめられた培養液、あるいは精製されたIgMなどが挙げられる。またIgMの由来としては特に限定されないが、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシなどの動物が挙げられ、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それら

の混合物などを用いることが出来る。

【0010】こうしたIgMを還元する試薬としては、例えばジスルフィド結合を温和な条件で部分的に開裂し遊離スルフヒドリル基を形成せしめる還元剤が挙げられ、例えばシステイン、ジチオスレイトール、グルタチオンなどが挙げられる。以上のような還元剤を用いてIgMを還元して部分的にジスルフィド結合を開裂するにあたっては、特に限定されないが、例えば反応時間を短く設定したり、反応時のpHを調整して徐々の温和な還元となるようにしたり、反応時の温度を低くしたり、試薬濃度を低くしたりして温和な条件とすることにより、分子量がIgMの1/5の均一なサブユニットに解離し、その際IgM 1分子あたり10個のHS-基の遊離がみられる。こうして還元されたIgMを含む液は、必要に応じIgM精製処理に付されることができるし、そのまま次の処理に付すこともできる。好ましくは、還元処理の前にIgMを精製工程に付したものを使用することが好ましい。例えばIgMを含む液は塩析工程、透析、濾過などの粗精製を行い、次にゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどを用いて精製することが出来る。

【0011】こうして得られた還元されたIgMは、次にその遊離スルフヒドリル基がS-S結合を形成するのを防止するため修飾剤で処理される。遊離スルフヒドリル基の修飾剤としては、実質的にIgMとしての利用上の問題がなければ特に限定されないが、例えばヨード酢酸、ヨード酢酸アミド、プロモ酢酸、プロモ酢酸アミド、クロロ酢酸、クロロ酢酸アミド、2-プロモプロピオン酸などのハロゲン化酢酸又はその誘導体、N-エチルマレイミド又はその誘導体、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)、2, 2'-ジチオビスピリジン、4, 4'-ジチオビスピリジン、6, 6'-ジチオビスニコチン酸などのアリールジチオ化合物、2-ニトロスルフェニルクロリドなどのアリールフェニルクロリド、p-クロロマーキュリ安息香酸、p-ヒドロキシマーキュリ安息香酸、フェニル酢酸水銀などの水銀誘導体化合物、メチルp-ニトロベンゼンスルホネート、メチルメタンチオスルホネートなどのスルホネート化合物、O-メチルイソ尿素、テトラチオン酸カリウム、テトラチオン酸ナトリウムなどのチオン酸塩、2-ヒドロキシエチルジスルフィドなどが挙げられる。還元されたIgMに存在する遊離スルフヒドリル基を、アミノエチル化、S-メチル化、ヨードアセチル化することは、好ましい。

【0012】こうして修飾されたIgMを含む液は、必要に応じ修飾IgM精製処理に付されることができるし、そのまま使用に付すこともできる。例えば修飾されたIgMを含む液は塩析工程、透析、濾過などの粗精製

を行い、次にゲル濾過クロマトグラフィーなどを用いて精製することが有効である。こうして得られた修飾IgMは、さらに必要に応じ標識を施すこともできる。例えば放射性ヨウ素などの放射性同位体などで標識することもでき、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ガラクトシダーゼなどの酵素、アクリジニウム塩、フルオレッセインなどの発光あるいは蛍光標識など、ビオチンなどで標識することもできる。こうして得られた修飾IgMは、さらに通常の免疫学的測定法に用いることが出来る。免疫学的測定法としては、使用する標識、測定手法などに従い種々の方法が知られ、例えば放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、凝集免疫測定法、サンドイッチ法、競合法などが挙げられる。さらにこの還元処理されると共に標識剤で標識化された標識IgM試薬は、好ましくはサンドイッチ・アッセイ法による抗原測定系に使用することができる。

【0013】より具体的な態様においては、本発明は、試料を一旦緩衝剤、希釈液又は希釈剤などの水溶液で幾分か希釈し、つぎに試料を少なくとも修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液により希釈した後、試料中の抗ウイルス特異的IgM抗体などの特定の抗原に特異性をもつIgM抗体を、抗ヒトIgM抗体で被覆した固相担体などと反応させて試料中のIgM抗体を固相抗ヒトIgM抗体と免疫学的に反応させ、(a)つぎにウイルスなどの特定の抗原試薬を免疫学的に反応させ、得られた反応生成物に化学発光標識抗ウイルス抗体などの標識抗体を免疫学的に反応させるか、または(b)ウイルスなどの特定の抗原試薬を標識剤で標識した標識抗原を免疫学的に反応させることからなることを特徴とする特異的IgM抗体の測定法及びその測定法に用いる試薬が提供される。また別の具体的な態様においては、本発明は、対象抗原を含有する被検試料に第1の抗体と第2の抗体を接触させることにより前記対象抗原と前記第1の抗体と前記第2の抗体とからなる複合体を形成させる工程を含む免疫学的測定方法において、前記第1の抗体と前記第2の抗体のいずれか一方が、少なくともIgMまたはIgM含有水溶液を還元処理し、ついで遊離スルフヒドリル基と反応可能な修飾剤で処理して得られた修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液でありかつ当該IgMが標識剤で標識化されたものであることを特徴とする方法を提供する。より好ましくは該方法は、前記被検試料を当該被検試料中の対象抗原に対する固相担体に結合されている第1抗体(固相化抗体)及び標識されている第2抗体(標識且つ修飾IgM抗体)とに接触させ、当該固相化第1抗体と当該抗原と当該標識IgM第2抗体との複合体を形成させ、当該複合体を未反応標識抗体から分離した後、当該複合体における標識抗体又は未反応標識抗体のいずれかを測定することを特徴とするものである。被検試料中の対象抗原と各抗体との接触は、同時に当該

固相化第1抗体と当該標識且つ修飾IgM第2抗体とを当該被検試料中の対象抗原に接触させるものであってもよいし、あるいは先ず該被検試料中の対象抗原と固相化第1抗体とを接触させ、必要に応じ、洗浄処理を加えた後、当該標識且つ修飾IgM第2抗体を接触させるものであってもよいし、さらには先ず該被検試料中の対象抗原と標識且つ修飾IgM第2抗体とを接触させ、次に当該固相化第1抗体を接触させるものであってもよい。典型的にはサンドイッチ法として広く知られた種々の手法を適用することができる。

【0014】特に好ましい測定系の例としては、HAV感染の急性期に生ずる、IgM型の抗HAV抗体を測定することによりA型肝炎の感染を診断する方法が挙げられる。このIgM型の抗HAV抗体を特異的に測定する系では、 $\mu$ 鎖特異性の抗ヒトIgM抗体で被覆した固相、例えば下記に示すような固相担体を、測定試料と反応させ、次にHAV抗原試薬と反応させ、最後に標識抗HAV抗体と反応させるというように順次反応させることにより行われる。A型肝炎ウイルス(HAV)は、1973年フェインストーン(Feinstone)等によりA型肝炎急性期患者の便材料のうちに発見され、1977年には実験感染チンパンジー肝組織における増殖の報告がされてのち、1979年には初代マーマーセット肝細胞及びアカゲザル胎児腎細胞での増殖が報告されて以来、HAVを培養細胞系では初代及び株化アフリカミドリザル腎細胞、ヒト二倍体細胞などにおいて増殖せしめることが報告されている。HAVは糞便などによる経口感染をその主な伝播経路とするため、環境衛生の不備な地域での感染の危険は大きく、最近では海外渡航の機会も増加し、こうしてHAV感染の検査が、近親者間、従業員者間などでの感染を防ぐ意味でも重要視されている。

【0015】この急性期のHAV感染の検出のためには、HAV感染に伴って生体内の強い免疫反応により患者の血液中に出現する抗HAV抗体、特にHAVに特異的なIgM抗体を検出して行われており、この抗HAV(IgM)抗体と免疫学的に反応性を有するHAV抗原を試薬として用いる次のようなIgM抗体捕捉測定法が開発されている。代表的なIgM抗体捕捉測定法にしたがう急性A型肝炎の感染診断法は、IgM抗体の $\mu$ 鎖に特異性をもつ抗ヒトIgM抗体を使用し、その抗ヒトIgM抗体( $\mu$ 鎖特異抗体)で被覆した固相、例えば下記に示すような固相担体を、測定試料と反応させ、次にHAV抗原試薬と反応させ、最後に標識抗HAV抗体と反応させるというように順次反応させることにより行われている。

【0016】ところが、このような急性期においては血液、血清、血漿などの被検試料中の抗HAV(IgM)抗体などの測定すべき特異的なIgM及び総IgMの濃度は様々である。一般には、血液中の総IgM量は通常

約0.4~2mg/ml存在していることが知られているが、上記した第一反応での抗ヒトIgM抗体で被覆した固相の抗体量が充分でない場合が起こるので、被検試料を前希釈、例えば、高倍率の前希釈を行うことが必要であるという問題がある。従来は、緩衝水溶液、生理食塩水溶液などで被検試料を前希釈していた。こうすると総IgM抗体の量を減ずることになるが、総IgM抗体量に対する特異的IgM量の比率を減ずることはできない。そのため、必要な測定範囲を得ることが困難であるという問題がある。また自動化された測定系においては、希釈液量が制限されるという問題があり、測定範囲が限定されてしまうという問題があった。これを解決する手段として、例えば試料をヒトIgM含有フラクシオン、精製ヒトIgMなどの水溶液を添加して、試料中のIgM量に影響されることなく、目的の抗原に特異的なIgM抗体を測定できるようにする。

【0017】被検試料をIgM含有溶液で希釈する場合、前もって生理食塩水などで被検試料を適宜希釈してもよい。さらにヒトIgM溶液の添加処理により、より広範囲の測定を達成することもできるし、測定試料調製の手間、例えば試料濃度の調製などの測定範囲設定が簡易に行うことができるようになり、自動化免疫測定系における適用が容易になる。しかし、試薬としてより安定なIgMが好ましい。本発明では、修飾ヒトIgM含有フラクシオン、精製修飾ヒトIgMなどの水溶液を添加しても同様な利点が得られることを認識してなされている。こうして上記したように特異的なIgM、例えば、HAV関連抗体を検出したり、前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にし、例えば、A型肝炎などの高濃度領域における確実な測定法が可能になる。また、還元処理したIgM抗体を標識抗体として抗原測定系に使用すれば、安価かつ大量の標識抗体を供給することが可能になる。

【0018】本発明に従ったIgM型の抗HAV抗体を特異的に測定する系で用いられるHAV抗原試薬は、イン・ピトロの細胞培養法で得られたウイルス抗原を用いている。それは感染細胞を溶菌化して得られた細胞ライゼートから分離されたHAV抽出物あるいはそれから誘導されたものが挙げられる。そのHAV抽出物は、例えばアフリカミドリザル腎培養細胞、ヒト肝臓腫瘍セルラインPLC/PRF/5、Hep. G2などのHAV感染細胞であって培養しうるもので、さらに好ましくは大量にHAVを産生しうるセルライン細胞を、公知の生育培地、例えばイーグル最小必須培地(Eagle's MEM)、ダルベッコ最小必須培地(Dulbecco's MEM)、PRM1-1640(Gibco社)、Eagle's MEM)、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジーン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)緩衝液添加イーグルMEM、リン酸緩衝化L-15-a培地、ハンクス液(Hanks'

balanced salt solution)などの生育培地で、必要に応じウシ胎児血清(FCS)、ペニンシリン、トレプトマイシンなどの抗生物質、酵母抽出液、バクトペプトン、ラクトアルブミン加水分解物、その他細胞成長因子などを添加したものの中で培養し、次にこうして得られた細胞培養物から次のようにして得られる。

【0019】つまり、上記のようにして得られた細胞培養物から栄養培地を除去し、ついで細胞を生理的食塩水、磷酸塩などで緩衝化された溶液などで、必要に応じEDTAなどのキレート化剤を添加したもので洗浄する。こうして単離・収獲された細胞を、代表的にはEDTAなどのキレート化剤及びポリオキシエチレンエーテル(代表的なものは、0.5%のTriton X-100などの商品名で入手しうる)などの非イオン界面活性剤を含む磷酸塩などで緩衝化された溶液、例えば1mMのEDTA及び0.5%のTriton X-100を含む磷酸塩緩衝化溶液、あるいはデオキシコール酸塩を含む磷酸塩などで緩衝化された溶液でもって溶菌処理し、こうして得られた細胞ライゼートを、必要に応じ、例えば約10~15分間インキュベーション処理し、つぎに遠心処理、例えば約1,000~20,000×g、好ましくは約2,000~10,000×gで、約5~60分間、好ましくは約10~30分間遠心処理し、HAV抽出物を得ることができる。このように、細胞ライゼートからその核由来物質、細胞オルガネラ、破砕物などを遠心分離処理して除き、HAV抽出物が得られている。HAV抽出物は、例えば米国特許明細書第4,721,675号に記載のようにしても得られる。HAV抽出物は、必要に応じ、例えばクロロホルム抽出法、酵素処理法、蔗糖濃度勾配遠心分離法などでさらに精製することもできる。

【0020】こうして得られたHAV抽出物は、つぎに公知の方法又はそれを修飾した方法によりその感染性を不活性化するための処理がなされる。不活性化処理は、例えばホルマリン液で処理する、例えば約37℃で約25~45%ホルマリン溶液の約1:3000~1:7000希釈下、例えば、1:4000希釈下にインキュベーション処理することにより行うことができるが、その他適切な方法を公知のものの中から選んで適用することが出来る。この処理は、例えば、2週間行うこともでき、さらにそれより短い時間あるいは長い時間でもよい。この処理の際の処理液においては、必要に応じ、緩衝剤、希釈液又は希釈剤、キレート化剤、保存剤などを添加して用いることもできる。

【0021】緩衝剤、希釈液又は希釈剤としては、水、リン酸緩衝液、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)緩衝液、生理食塩水などの塩化ナトリウム液、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジーン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)液、ピペラ



ジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIBES) 液、3-(シアノヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸 (CAPS) 液、3-(モルホリノ) プロパンスルホン酸 (MOPS) 液、アミノ酸液などが挙げられる。これらは単独でも、任意に組合わせて配合しても用いることができる。キレート化剤としては、エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA)、エチレンジアミン-β-アミノエチルエーテル-N, N', N'-トリテトラ酢酸 (EGTA) などが挙げられる。

【0022】本発明によれば、こうして得られた感染性が不活性化されたHAV抽出物は、それをそのままHAV抗原として用いることもできるし、さらにそれをつぎに界面活性剤で処理し得られたものも用いることができ、こうした界面活性剤処理HAV抽出物は好ましいものとして使用できる。界面活性剤としては、適切なものを公知又は市販のものの中から選んで用いることができ、特にアニオン性界面活性剤が適している。

【0023】アニオン性界面活性剤としては、ステアリン酸カリウムなどの炭素数12~18の高級脂肪酸のアルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩、胆汁酸のアルカリ金属塩、炭素数12~18の高級脂肪酸のトリエタノールアミンなどの有機塩基塩、ドデシル硫酸リチウム (LDS)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などの炭素数12~18の高級脂肪酸又は高級アルコールの硫酸エステル、アルキルスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムなどのアルキルアリースルホン酸塩などが挙げられ、特にLDS、SDSは著効を示す。アルカリ金属としては、ナトリウム、カリウム、リチウムなど、アルカリ土類金属としては、カルシウム、マグネシウムなどが挙げられる。これら界面活性剤は、共存する蛋白質の量に応じて、その使用量を選ぶことが好ましく、例えば約0.001% v/v~約10% v/vの範囲で用いることができる。特に好ましくはSDSを用い、約0.05% v/v~約5% v/v、より好ましくは共存する他の蛋白質が存在しない場合には約0.5% v/v~約1.0% v/vの範囲で用いることができる。

【0024】界面活性剤でHAV抽出物を処理するにあたっては、必要に応じてHAV抽出物を緩衝剤、希釈液又は希釈剤などで希釈し、所要濃度を与える界面活性剤溶液と混合するか、懸濁する。こうして得られた混合物は、必要に応じて攪拌処理されることができる。また場合によっては、混合物中にガラスビーズなどを加えて攪拌処理してもよい。攪拌処理は、測定感度を改善しうるものであれば、例えば穏やかな混合のみで済ますこともできるし、激しい攪拌混合であることもできる。処理温度は、室温で行うこともできるし、冷却下行うこともできるし、37℃あるいはそれ以上の温度とすることも測定感度を改善しうるものであれば、採用できる。界面活性

剤で処理されたHAV抽出物は、そのまま次の処理に使用できるし、あるいは一旦保存したのち次の処理に使用できるし、また必要に応じ遠心分離などの分離処理をし、さらに必要に応じ洗浄などの処理をして後、次の処理に使用できる。これらの処理は、測定時の非特異吸着を抑制し、感度を改善しうるように選ぶことができる。

【0025】本発明の界面活性剤処理の際の処理液においては、緩衝剤、希釈液又は希釈剤、キレート化剤、保存剤などを添加して用いることができる。緩衝剤、希釈液又は希釈剤としては、水、リン酸又はリン酸塩緩衝液、Tris緩衝液、例えば生理食塩水などの塩化ナトリウム液、HEPES液、PIBES液、CAPS液、MOPS液、N, N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸 (BES) 液、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸 (TES) 液、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸 (ACES) 液、アミノ酸液などが挙げられる。これらは単独でも、任意に組合わせて配合して用いることができる。キレート化剤としては、EDTA、EGTAなどが挙げられる。

【0026】本発明によれば、HAV抽出物は、必要に応じて、その感染性を不活性化する前に上記界面活性剤で処理し、つぎに得られた界面活性剤で処理されたHAVを、公知の方法又はそれを修飾した方法により不活性化処理してもよい。不活性化処理は、上記と同様にしてよく、例えば約37℃で約37%ホルマリン溶液の1:4000希釈下にインキュベーション処理することにより行うことができる。

【0027】より具体的な態様において、本発明で用いられるHAV抗原試薬は、イン・ビトロの細胞培養法で得られた細胞ライゼートから得られたHAV抽出物を約0.5% v/v~約1.0% v/vの範囲の濃度のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 液と混合し、つぎに必要なに応じ、例えば室温で3時間インキュベーション処理し、SDS処理HAV抽出物を得ることによって提供されるものであることもできる。本発明では、少なくとも1gMまたは1gM含有水溶液処理工程と組合せ、その該得られたSDS処理HAV抽出物を用いた試料中のHAV抗体の免疫測定試薬及びそれを用いた試料中の抗体の測定法も提供される。また抗原、例えば、HBc抗原などは、ウイルス培養物から得ることもできるが、遺伝子組換えの手法を用い、大腸菌、酵母などで発現させた組換え抗原であることもできる。

【0028】本発明において試料中の特異的IgM抗体を測定するにあたっては、抗IgM抗体を、必要に応じて、例えば、寒天、アガロース、架橋アガロース、架橋アルギン酸、セルロース、ニトロセルロースやカルボキシルセルロースなどのセルロースエステルあるいは混合セルロースエステル、紙、デキストラン、ゼラチン、架橋ゼラチン、キチン、コラーゲン、綿などの生体由来高

分子あるいは天然物由来高分子、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体、ポリメタクリレート、ポリアクリルアミドなどのアクリル樹脂、イオン交換樹脂、光架橋樹脂、ポリエステル、ポリアミド、ポリウレタン、ポリアセタールなどの合成高分子・樹脂などの天然あるいは合成の修飾あるいは非修飾の重合炭水化物、重合炭化水素など、それらの架橋誘導体など、ガラス、例えば活性化ガラスなど、シリカゲル、アルミナ、シリカ-アルミナ、硫酸バリウム、セラミック、カーボン、硫酸マグネシウムなどの無機質材料などからなる微粒子、ビーズ、マイクロプレート、マイクロタイターウェル、マイクロチューブ、ストリップ、メンブレン、トレイ、ゲルなど、さらには赤血球、ゴム、ラテックス粒子、乳剤などの固相に固定しておき、この固相を、分析対象としての特異的IgM抗体を含有する試料と接触させ、こうして固相化された抗IgM抗体と、分析試料中の特異的IgM抗体とを免疫学的に反応せしめ、この固相に結合した特異的IgM抗体を検知することにより行うことができる。さらにまた、上記固相はサンドイッチ法に用いられる固相として用いることができる。そして固相には抗原、抗体など免疫学的反応に関与する様々な分子種や物質を固定化することができる。通常サンドイッチ法で良く知られたものが特に制限無く用いることができる。好ましい態様において、本発明では試料と反応せしめられる抗ヒトIgM抗体結合固相としては、ポリスチレン製のビーズ、ポリスチレン製の微小粒子などを用いることができる。

【0029】また、抗体としては、ヒトIgMに対する抗体であれば特に限定されることなく用いることができる。抗体は常法により得ることができ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、統生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学I11、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて、例えばウマ、ウシ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、ラット、マウスなどを免疫するなどして得たり、モノクローナル抗体であることもでき、これらは単独でもあるいはこれらを組合せて用いることは任意にできる。これら抗体は、必要なら、ペプシン、パバインなどの酵素で消化して、F(ab')<sub>2</sub>、Fabとして使用してもよい。抗ヒトIgM抗体としては、好ましくはμ鎖に対して特異的に反応する抗体、抗μ鎖抗体が挙げられ、これらはマウスミエロマ細胞を用いて細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってもよいことはいうまでもない。また、抗原を測定する際

に用いる標識IgM抗体は、モノクローナル抗体であってもよいことはいうまでもない。

【0030】ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法などでは、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>Hなどの放射性物質、西洋わさびペルオキシダーゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素、フルオレッセインなどの蛍光色素、アクリジニウムエステル類などの化学発光色素、金コロイド、セレンウムコロイドあるいは有色ラテックス粒子などの有色物質などで標識された抗原あるいは抗体が試薬として用いられ、分析試料中の抗体あるいは抗原と直接または間接的に結合反応せしめられ、その放射性、酵素活性、化学発光あるいは色の有無などを測定して、試料中の抗体等が存在していたか否かを判別することができる。本発明においては、特に化学発光標識法、例えばアクリジニウムエステル類あるいは蛍光標識法、例えばフルオレッセンスなどで標識された抗体試薬を用いる発光あるいは化学発光免疫測定法は自動化された測定ができ好ましい方法である。特にアクリジニウムエステル類で標識された抗体試薬を用いる化学発光免疫測定法は自動化された測定ができ好ましい。

【0031】アクリジニウムエステル類としては、例えば特開昭62-39598号公報、特開昭62-61969号公報、特開昭63-57572号公報、特開昭63-101968号公報、特開昭63-112564号公報、特開平1-199949号公報、特開平1-261461号公報、特開平2-96567号公報、特開平2-133469号公報、特開平2-503268号公報、特開平2-501772号公報、欧州特許公開出願第0082636号、英国特許明細書第1、461、877号、米国特許明細書第3、539、574号などに記載のN-アルキル又はアリールアクリジニウム-9-カルボン酸エステルなどが挙げられる。

【0032】特に、特開昭63-112564号公報、米国特許明細書第3、539、574号などに記載の10-アルキル・N-アルキル又はアリールスルホニル-N-アルキル又はアリールスルホニルアクリジニウム-9-カルボキサミド、N-メチルアクリジニウム-9-カルボン酸エステルなどは代表的な化学発光標識として挙げられる。アクリジニウム標識の場合、測定前に発色試薬処理、例えば過酸化水素、例えば約0.01%～約0.1%の過酸化水素水溶液、及び水酸化ナトリウム、例えば約0.05N～約0.5Nの水酸化ナトリウム水溶液で処理してから、ルミノメーターなどを用いて測定を行うことができる。勿論、標識剤は上記のものに限定されることなく、測定に使用される機器、場所などを考慮し、適宜当該分野で使用することが知られているものの中から目的に応じ選択して用いることができる。

【0033】固相あるいは標識などと抗原あるいは抗体などとを結合あるいは吸着させるには、当該分野で汎用

されている方法を用いることができ、例えばイオン相互作用、疎水相互作用、共有結合などの物理的吸着や化学的結合により行うことができる。例えば、架橋剤としては、グルタルアルデヒド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、N,N'-o-フェニレンジマレイミド、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、N-スクシンイミジル S-アセチルメルカプトアセテート、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル

8-マレイミドヘキサノエート、N-スクシンイミジル 4-ヨードアセチルアミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオネート、N-スクシンイミジル m-マレイミドベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-マレイミドブチレート、N-スクシンイミジル (p-マレイミドフェニル)アセテート、N-スクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブチレートなどが挙げられる。

【0034】本発明の測定系においては、界面活性剤、緩衝剤、希釈液又は希釈剤、ブロッキング剤、キレート化剤、保存剤などを含有させるようにして用いることができる。界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン（代表的なものは、Tween 20などの商品名で入手しうる）、ポリオキシエチレンエーテル（代表的なものは、Triton X-100などの商品名で入手しうる）、オクチルフェノール・エチレンオキサイド縮合物（代表的なものは、Nonidet P-40などの商品名で入手しうる）などが挙げられる。

【0035】緩衝剤、希釈液又は希釈剤としては、上記したような水、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、生理食塩水など、HEPES液、PBES液、CAPS液、MOPS液、アミノ酸液などが挙げられる。これらは単独でも、任意に配合しても用いることができる。キレート化剤としては、EDTA、EGTAなどが挙げられる。

【0036】保存剤としては、例えばナトリウムアジド、エチルパラベンなどが挙げられる。その他、本発明の測定系には、各種動物の血清、例えばウシ血清、ウシ血清アルブミン（BSA）、ウシ胎児血清（FCS）、ヤギ血清、豚白アルブミン、ゼラチン、各種乳蛋白質、例えばスキムミルク、カゼイン、カゼイン分解物、ホエー蛋白質など、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどからなる群から選ばれたものを添加することができる。

【0037】本発明においては、試薬は単一の容器あるいは複数の容器に入れてあり、使用にあたり配合されて用いようになっている。IgM抗体測定の代表的なHAV感染診断のための測定系のより具体的な態様においては、本発明は、試料を適当な濃度に生理食塩水などで希釈し、例えば約80~120倍、好ましくは約100倍に希釈し、ついで適当な量の修飾ヒトIgM溶

液及び抗ヒトIgM抗体結合固相担体あるいは粒子状担体などを反応させ、次に（1）HAV感染培養細胞から収獲されたHAV抽出物又は（2）このHAV抽出物を少なくとも界面活性剤、例えばSDSで処理して得られたHAV抗原と免疫学的に反応させ、得られた反応生成物に化学発光標識抗HAV抗体、例えばアクリジニウム標識抗HAV抗体を免疫学的に反応させ、過酸化水素溶液及び水酸化ナトリウム溶液からなるトリガー試薬と反応させた後検知を行うことを特徴とするHAV抗体の測定法が提供される。

【0038】本発明においては、特異的IgM抗体を測定する公知の免疫学的測定法にそれを利用可能であり、例えば、ウイルス感染、病原性微生物感染などにより生ずる特異抗体測定系に応用できると考えられる。ウイルスとしては、単純ヘルペス、帯状ヘルペス、水痘ウイルス、ムンプス、麻疹、風疹、AIDSウイルス（HIV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）などが挙げられ、病原性微生物などとしては、ボツリヌス菌（Clostridium botulinum）、ウェルシュ菌（Clostridium perfringens）、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、例えば、MRSA、赤痢菌（Shigella dysenteriae）、百日咳菌（Bordetella pertussis）、腸炎菌（Salmonella enteritidis）などが挙げられる。

#### 【0039】

【実施例】次に実施例を示して、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこの具体例により限定されるものでなく、その思想に従うかぎり各種の形態で実施できることは理解されるべきである。

#### 【0040】実施例1

##### 修飾IgMの調製

市販のヒトIgM溶液（米国ケミコン・インターナショナル [Chemicon International, USA.] 社製）を1mg/mlとなるように、0.9%塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含有する10mMトリス（Tris）塩酸緩衝液（pH8.5）（以下、「ヒトIgM用緩衝液」という）中に希釈し、得られたヒトIgM溶液に、ジチオスレイトール（DTT）を含有し、0.9%塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含有する10mMリン酸緩衝液（pH8.5）をDTT濃度が2mMになるように加え、室温で1時間処理した。次にDTT処理ヒトIgM溶液に、ヨード酢酸を含有し、0.9%塩化ナトリウム及び0.1%アジ化ナトリウムを含有する10mMトリス（Tris）塩酸緩衝液（pH8.0）を、DDTに対してヨード酢酸が5倍モル量になるように加え、室温で時間処理した。得られた修飾IgM溶液を、ヒトIgM用緩衝液中で透析し、残存したDDT、ヨード酢酸及びその混合物を十分に取り除いた後、ヒトIgMの濃度で75µg/mlになるようにヒトIgM用緩

衡液で希釈し、4℃で様々な時間保存し、希釈用ヒトIgM試薬として用いた。

【0041】抗ヒト $\mu$ -IgM抗体被覆微粒子の調製  
ヤギから得られたヒトIgMの $\mu$ 鎖に対して特異性をもポリクローナル抗体(米国ジャクソン・イムノ・リサーチ・ラボ社製 [Jackson ImmunoResearch Labo., USA.])をカルボキシル化ポリスチレンラテックス微粒子(米国セラダイン社製 [Seradyn, USA.]; 0.2 $\mu$ m)に以下に記載の方法で結合した。まず、0.015MのMES(2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)緩衝液(pH4.7)中の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC; 16mg/ml)を用いてポリクローナル抗体抗ヒトIgM抗体(160mg/ml)を室温で1.5時間かけて結合した。次に1%ツイーン(Tween)20及び0.9%NaClを含有する0.05Mのリン酸緩衝液(pH7.2)を用いて洗浄した。最終的には、0.05%ゼラチン、0.1%ツイーン20、0.9%NaCl及び0.1%アジ化ナトリウムを含有する0.01Mのトリス(Tris)緩衝液(pH7.4)中に貯蔵した。被覆微粒子の固形分の%が、0.0625%になるように貯蔵バッファーで希釈し、抗ヒト $\mu$ -IgM抗体被覆微粒子試薬とした。

【0042】アクリジニウム標識抗HAV抗体の調製  
 $\beta$ -アラニンアクリジニウム(1mg)を無水ジメチルホルムアミド(DMF)(100 $\mu$ l)中に溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(5.75mg/ml、50 $\mu$ l)及びEDAC(9.6mg/ml、50 $\mu$ l)を連続して添加し、暗所、25℃で48時間攪拌することにより活性化した。プロテインA精製モノクローナル抗HAV抗体(1mg/ml)を含有している、0.9%NaCl及び0.5%CHAPSを含む0.1Mのリン酸緩衝液(pH8.0)に活性化アクリジニウムを加え(抗体の4倍のモル数)、反応混合物を室温で10分間攪拌した。緩衝液を0.1%CHAPS、0.1%アジ化ナトリウム及び0.9%NaClを含有する0.01Mのリン酸緩衝液(pH6.3)に置き換えた後、調整物を遠心分離にかけ、上清を置換後のものと同じ緩衝液で平衡化したバイオシル SEC 250(米国バイオラド社製[BioRad, USA.])のHPLCカラム上のクロマトグラフィーにかけた。それぞれのフラクション(1ml)を369nm及び280nmでの紫外分光分析により分析し、アクリジニウムの結合量を決定した。結合体を濃縮フラクション(約100 $\mu$ g/ml)中、約4℃で貯蔵し、使用前に1%カゼインナトリウム、0.1%ツイーン20、0.1%アジ化ナトリウム、5mM EDTA及び0.9%NaClを含有する0.05Mのリン酸緩衝液(pH6.3)で希釈し、アクリジニウム標識抗HAV抗体試薬とし

た。

#### 【0043】HAV抗原の調製

HAVは栄養培地中のバースーアレキサンダー細胞(Barth-Alexander Cells)を用いて培養した。培養細胞に、0.5%トライトン(Triton)X-100を含有しかつ5mM EDTA及び0.9%NaClを含む0.02Mリン酸緩衝液(pH7.2)を混合し、36℃で16~68時間攪拌した後、遠心分離にかけ、上清を捨てることにより、HAV抽出物をホルムアルデヒド希釈倍率で1:4000となるように添加した後、36℃で3日間攪拌して、HAVの感染性を不活性化した。不活性化したHAV抽出物は、1%牛血清アルブミン、0.05%ツイーン20、0.1%アジ化ナトリウム、5mM EDTA及び0.9%NaClを含有する0.01Mのリン酸緩衝液(pH7.2)で希釈し、HAV抗原試薬とした。HAV抗原試薬は使用時まで4℃で貯蔵した。

#### 【0044】アッセイ

HAV-M陽性パネル試料を生理食塩水で希釈した。室温で様々な時間保存した修飾IgM試薬(30 $\mu$ l)を用いて希釈試料をさらに5倍に希釈した。比較としてHAVAB-M陰性パネル試料を生理食塩水で希釈した後、IgMを希釈する際に用いた緩衝液を用いてさらに5倍に希釈した。希釈した試料(135 $\mu$ l)を容器に入れ、これに抗ヒト $\mu$ -IgM抗体被覆微粒子試薬(30 $\mu$ l)を添加し、37℃で20分間反応させた。反応した微粒子をガラス繊維フィルターで捕捉し、0.1Mのホウ酸緩衝液(pH8.5)(300 $\mu$ l)で2回洗浄した。次にHAV抗原試薬(30 $\mu$ l)をフィルター表面に添加し、37℃で20分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液(pH8.5)(100 $\mu$ l)で1回、そして同緩衝液(300 $\mu$ l)で1回洗浄した。次にアクリジニウム標識抗HAV抗体試薬(30 $\mu$ l)をフィルター表面に添加し、37℃で10分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液(pH8.5)(100 $\mu$ l)で1回、そして同緩衝液(300 $\mu$ l)で1回洗浄した。

【0045】このフィルターを化学発光読取り機に移し、この中で0.25NのNaOH中の0.4%過酸化水素を含む発色溶液(50 $\mu$ l)をフィルターに送り込んだ。微粒子に結合したアクリジニウムが発光し、生じた光の量を測定した。結果を図1に示す。無処理のIgM試薬では、保存時間の経過と共にIgM分子の凝集による発光量(光子カウント)の増加が観察されるが、DIT処理後ヨード酢酸で修飾したIgM試薬では、保存時間の経過によっても発光量(光子カウント)の増加はない。

#### 【0046】実施例2

#### SDS処理HAV抗原の調製

HAVは栄養培地中のバーサーアレキサンダー細胞 (Barth-Alexander Cells) を用いて培養した。培養細胞に、0.5%トライトン (Triton) X-100を含有しかつ5mM EDTA及び0.9%NaClを含む0.02Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) を混合し、36℃で16~68時間攪拌した後、遠心分離にかけ、上清を捨てることにより、HAV抽出物をホルムアルデヒド希釈倍率で1:4000となるように添加した後、36℃で3日間攪拌して、HAVの感染性を不活性化した。不活性化したHAV抽出物にSDSを添加し、室温で24時間攪拌して、SDS処理HAV抽出物を得た。SDSは1.2wt%までの各種濃度となるようにして添加した。SDS処理HAV抽出物は、0.1%のアジ化ナトリウム、5mM EDTA及び0.9%NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈して、SDS処理HAV抗原試薬とした。SDS処理HAV抗原試薬は使用時まで4℃で貯蔵した。

#### 【0047】アッセイ

実施例1と同様にして、HAV-M陽性パネル試料を生理食塩水で希釈した。希釈試料を修飾IgM試薬 (30 $\mu$ l) を用いてさらに5倍に希釈した。比較としてHAV-M陰性パネル試料を生理食塩水で希釈した後に、無処理IgM試薬を用いてさらに5倍に希釈した。希釈した試料 (125 $\mu$ l) を容器に入れ、これに抗ヒト $\mu$ -IgM抗体被覆微粒子試薬 (30 $\mu$ l) を添加し、37℃で20分間反応させた。反応した微粒子をガラス繊維フィルターで捕捉し、0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (300 $\mu$ l) で2回洗浄した。次にSDS処理HAV抗原試薬 (30 $\mu$ l) をフィルター表面に添加し、37℃で20分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (100 $\mu$ l) で1回、そして同緩衝液 (300 $\mu$ l) で1回洗浄した。次にアクリジニウム標識抗HAV抗体試薬 (30 $\mu$ l) をフィルター表面に添加し、37℃で10分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (100 $\mu$ l) で1回、そして同緩衝液 (300 $\mu$ l) で1回洗浄した。このフィルターを化学発光読取り機に移し、この中で0.25NのNaOH中の0.4%過酸化水素を含む発光溶液 (50 $\mu$ l) をフィルターに送り込んだ。微粒子に結合したアクリジニウムが発光し、生じた光の量を測定した。実施例1と同様な結果が得られた。

#### 【0048】実施例2

実施例1と同様にして、HAV-M陽性パネル試料を生理食塩水で希釈した。希釈試料を種々の濃度に修飾IgM試薬を用いてさらに希釈した。比較としてHAV-M陰性パネル試料を生理食塩水で希釈した後に、無修飾IgM試薬を用いて希釈した。希釈した試料 (125 $\mu$ l) を容器に入れ、これに抗ヒト $\mu$ -IgM抗体被覆微粒子試薬 (30 $\mu$ l) を添加し、37℃で20分間反応させた。反応した微粒子をガラス繊維フィルターで捕捉し、0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (300 $\mu$ l) で2回洗浄した。次にSDS処理HAV抗原試薬 (30 $\mu$ l) をフィルター表面に添加し、37℃で20分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (100 $\mu$ l) で1回、そして同緩衝液 (300 $\mu$ l) で1回洗浄した。次にアクリジニウム標識抗HAV抗体試薬 (30 $\mu$ l) をフィルター表面に添加し、37℃で10分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (100 $\mu$ l) で1回、そして同緩衝液 (300 $\mu$ l) で1回洗浄した。このフィルターを化学発光読取り機に移し、この中で0.25NのNaOH中の0.4%過酸化水素を含む発光溶液 (50 $\mu$ l) をフィルターに送り込んだ。微粒子に結合したアクリジニウムが発光し、生じた光の量を測定した。実施例1と同様な結果が得られた。

gM試薬を用いて希釈した。希釈した試料 (125 $\mu$ l) を容器に入れ、これに抗ヒト $\mu$ -IgM抗体被覆微粒子試薬 (30 $\mu$ l) を添加し、37℃で20分間反応させた。反応した微粒子をガラス繊維フィルターで捕捉し、0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (300 $\mu$ l) で2回洗浄した。次にSDS処理HAV抗原試薬 (30 $\mu$ l) をフィルター表面に添加し、37℃で20分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (100 $\mu$ l) で1回、そして同緩衝液 (300 $\mu$ l) で1回洗浄した。次にアクリジニウム標識抗HAV抗体試薬 (30 $\mu$ l) をフィルター表面に添加し、37℃で10分間フィルター表面に捕捉されている微粒子と反応させた。フィルターを0.1Mのホウ酸緩衝液 (pH 8.5) (100 $\mu$ l) で1回、そして同緩衝液 (300 $\mu$ l) で1回洗浄した。

【0049】このフィルターを化学発光読取り機に移し、この中で0.25NのNaOH中の0.4%過酸化水素を含む発光溶液 (50 $\mu$ l) をフィルターに送り込んだ。微粒子に結合したアクリジニウムが発光し、生じた光の量を測定した。得られた結果を図2に示す。図2中横軸は試料を希釈するために添加された無修飾IgM試薬及び修飾IgM試薬で希釈したときの試料中の濃度で、7.5 $\mu$ g/リットルのIgMを1とした。図2より修飾ヒトIgM含有液で希釈することにより、より少量のIgM含有液の使用で効果が得られることが判明した。こうした測定系において、修飾IgM試薬は保存性、利便性、そして5量体のままのIgMを添加する場合に比べて優れた希釈効果が得られることがわかる。免疫学的測定における試薬として、このように優れた性状を示すことは予想外のことである。

#### 【0050】

【発明の効果】試料中のIgM抗体の測定において、希釈液量の制限を回避し、必要な測定範囲を得ると共により優れた測定を行うため、被検試料を少なくとも修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液により希釈することで、安定した、さらに自動化された広範囲の測定系を組み立てることが可能となった。修飾IgMまたは修飾IgM含有水溶液は、保存安定性に優れ、簡便に利用できる、さらに非修飾IgMよりも大きな効果をもたらす。より早い時期 (急性期) で特異的なIgM、例えば、HAV関連抗体を検出したり、前希釈の希釈倍率を低減せしめてより広範囲の測定を可能にし、例えば、A型肝炎患者などの診断・検出を確実に行なうことが可能になる。修飾IgMは分子量が低下しているため、沈殿・凝集を起こしにくい。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】種々の時間保存した後の修飾IgM希釈液で希釈された場合と非修飾IgM希釈液で希釈された場合との免疫測定での発光量における関係を示す。

【図2】 修飾IgM量及び非修飾IgMの添加量と試料希釈必要量との関係を示す。

【図1】

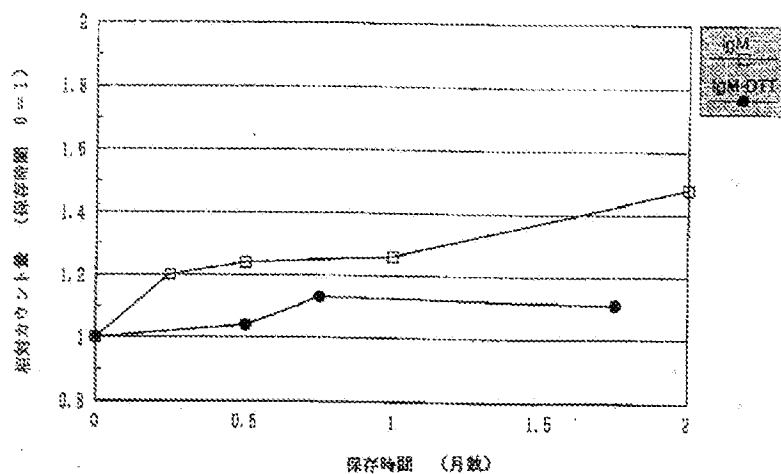


図1 免疫測定における非修飾IgM (IgM) 及び修飾IgM (IgM-DTT) の安定性

【図2】

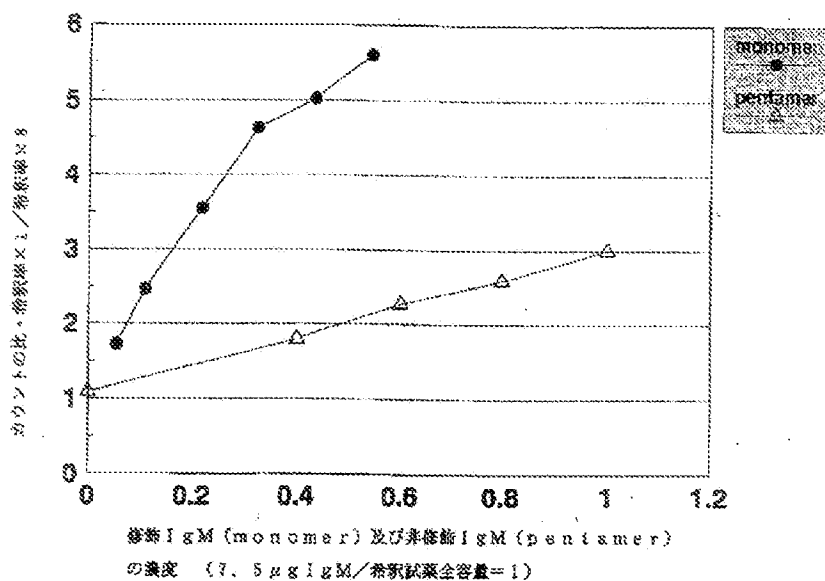


図2 免疫測定における添加IgMの量とその反響効果との関係